# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12P 13/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 99/18228

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

15. April 1999 (15.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/06210

**A2** 

(22) Internationales Anmeldedatum:

30. September 1998

(30.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 43 894.6 198 31 609.7 4. Oktober 1997 (04.10.97) 14. Juli 1998 (14.07.98)

DE DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Postfach 1913, D-52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIKMANNS, Bernd [DE/DE]; Gleißelstetten 49, D-89081 Ulm (DE). PE-TERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Steinenkamp 1, D-51496 Bergisch-Gladbach\* (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Julich (DE).

(74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker-Gundahl-Strasse 36, D-81479 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, ID, JP, KR, MX, RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

#### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD

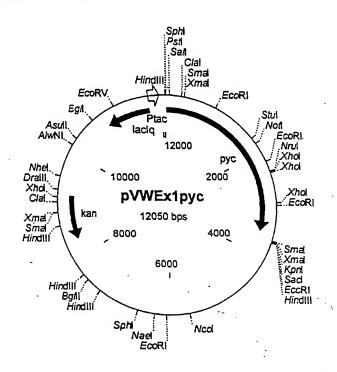
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DER ASPARTAT- UND/ODER GLUTAMATFAMILIE UND IM VERFAHREN EINSETZBARE MITTEL

# (57) Abstract

The invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family in which the pyruvate-carboxylase activity is increased by genetically changing the enzyme and/or the pyruvate-carboxylase gene expression of a microorganism which produces the corresponding amino acid. In addition, the invention relates to a pyruvate-carboxylase gene and additional agents which can be used in the inventive method.

### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzieren Mikroorganismus erhöht wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat-Carboxylase-Gen sowie weitere, erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.



# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

I	AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho -	SI	Slowenien
١	AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
1	AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ı	AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
I	AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
ı	BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
١	BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
I	BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
I	BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
	BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
Ì	BJ	Benin	IE	Irland ·	MN	Mongolei	UA	Ukraine
1	BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
1	BY	Belarus	IS	Island ·	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
ı	CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
ı	CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ.	Usbekistan
ı	CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
	CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
ı	CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
Ì	CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
ı	CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
	CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumanien		
1	CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
	DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
	DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
	EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

# Beschreibung

5

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie und im Verfahren einsetzbare Mittel

10

15

20

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie gemäß den Ansprüchen 1 bis 17. Pyruvat-Carboxylase-Gene nach Ansprüch 18 bis 23, Genstrukturen nach Ansprüch 24, Vektoren nach Ansprüch 25, transformierte Zellen nach Ansprüch 26 bis 31 sowie Verwendungen nach Ansprüch 32 bis 37.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So wird z.B. L-Lysin wie auch L-Threonin, L-Methionin und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament oder L-Glutamat, L-Aspartat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z.B. Corynebacterium glutamicum und seine Verwandten ssp. flavum und ssp. lactofermentum (Liebl et al., Int J System Bacteriol 1991, 41:

2

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschalten der Kontrollmechanismen zu steigern Bei diesen Prozessen Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist beispielsweise ein Verfahren beschrieben, bei dem Corynebacterium-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Theoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849, GB 2 152 509).

Weiterhin rekombinante DNA-Techniken sind konstruierte auch durch Mikroorgansimen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedbackresistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin Bakterium mit feedback-resistenter produzierendes Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 123475/1986, EP 0 488 424).

25

5

10

15

20

Darüber hinaus wurden auch durch Überexpression von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese kodieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese

3

der Dihydrodipicolinatsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Isoleucinbildung erreicht (EP 0 436 886).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in Corynebacterium zu verbesserter Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 3331 145), wohingegen die Erhöhung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in Corynebacterium zu erhöhter Ausscheidung von Aminosäuren der Aspartatfamilie führte (EP 0 358 940).

Während des Wachstums und speziell unter Aminosäureproduktionsbedingungen muß der Tricarbonsäure-Cyclus kontinuierlich und effektiv mit C4-Verbindungen, z.B. Oxalacetat, aufgefüllt werden, um die für die Aminosäurebiosynthese abgezogenen Zwischenprodukte zu ersetzen. Bis vor kurzem hat man angenommen, daß für diese sogenannten anaplerotischen Funktionen in Corynebacterium Phosphoenolpyruvat-Carboxylase verantwortlich ist (Kinoshita, Biology of industrial micro-organisms 1985: 115 bis 142, Benjamin/Cummings Publishing Company, London; Liebl, The prokaryotes II, 1991: 1157 bis 1171, Springer Verlag N.Y.; Vallino und Stephanopoulos, Biotechnol Bioeng 1993, 41: 633 bis 646). Es wurde jedoch gefunden, daß Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-negative Mutanten im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auf allen getesteten Medien gleich wuchsen (Peters-Wendisch et al., FEMS Microbiology Letters 1993, 112: 269 bis-274; Gubler et al., Appl Microbiol Biotechnol 1994, 40: 857 bis 863). Dieses

25

5

10

15

4

Ergebnis zeigte, daß die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nicht essentiell für das Wachstum ist und für die anaplerotischen Reaktionen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Desweiteren wies das oben genannte Ergebnis darauf hin, daß es in Corynebacterium mindestens ein anderes Enzym geben muß, das für die Synthese von Oxalacetat, das für das Wachstum benötigt wird, verantwortlich ist. eine Pyruvat-Carboxylase-Aktivität Kürzlich wurde auch tatsächlich permeabilisierten Zellen von Corynebacterium glutamicum gefunden (Peters-Wendisch et al., Microbiology 1997, 143: 1095 bis 1103). Dieses Enzym wird effektiv durch AMP, ADP und Acetyl-Coenzym A inhibiert und in Gegenwart von Laktat als Kohlenstoffquelle in erhöhter Menge gebildet. Da davon ausgegangen werden mußte, daß dieses Enzym in erster Linie für die Auffüllung des Tricarbonsäure-Cycluses beim Wachstum verantwortlich ist, war zu erwarten, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität entweder zu keiner oder allenfalls zu einer geringfügigen Erhöhung der zur Aspartatfamilie gehörenden Aminosäuren führt. Desweiteren wurde erwartet, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität der Pyruvat-Carboxylase ebenso keinen Einfluß auf die Produktion von Aminosäuren anderer Familien haben würde.

20

5

10

15

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Genexpression die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder der Glutamatfamilie erhöht wird. Es zeigte sich, daß insbesondere Stämme mit erhöhter Kopienzahl des Pyruvat-Carboxylase-Gens etwa 50% mehr Lysin, 40% mehr Threonin und 150% mehr Homoserin ins Kulturmedium ausscheiden. Es zeigte sich weiterhin, daß überraschenderweise auch die Glutamatproduktion signifikant erhöht ist (vgl. insbesondere Ausführungsbeispiel unter 6. und Tabelle 4).

Die genetische Veränderung der Pyruvat-Carboxylase zur Erhöhung der Enzymaktivität erfolgt vorzugsweise durch Mutation des endogenen Gens. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder durch mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).

10

15

20

25

Die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Expression des Gens positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturgen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Pyruvat-Carboxylase-Gens zugeordneten Regulatorgens erfolgen. Desweitern kann ggf durch Mutation einer regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung eines Regulatorporteins an die DNA des zu regulierenden Pyruvat-Carboxylase-Gens so beeinflußt sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Desweiteren können dem Pyruvat-Carboxylase-Gen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Pyruvat-Carboxylase-Genexpression bewirken. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt bzw. Vektor eingebaut. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Sequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Für den Einbau des Pyruvat-Carboxylase-Gens in ein Genkonstrukt wird das Gen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung Corynebacterium isoliert und in einen Aminosäureproduzierenden Mikroorganismen-Stamm, insbesondere Corynebacterium oder in Escherichia coli oder Serratia marcescens, transformiert. Für das erfindungsgemäße 10 Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus C. glutamicum oder C. glutamicum ssp. flavum oder C. glutamicum ssp. lactofermentum. Nach Isolierung des Gens und der in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (vgl. z.B. Simon et al., Bio/Technology 1983, 1: 784 bis 791; Eikmanns et al., Gene 1991, 102: 93 bis 98) erfolgt die Transformation in die Aminosäure-produzierenden Stämme durch Elektroporation 15 (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters 1991, 65: 299 bis 304) oder Konjugation (Schäfer et al., J Bacteriol 1990, 172: 1663 bis 1666). Als Wirtsstämme werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäure dereguliert sind und/oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen. Weiterhin werden solche 20 erhöhten Anteil an solchen einen die Stämme bevorzugt, Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligt sind und / oder Stämme, die einen erniedrigten Anteil an den entsprechenden Aminosäure beteiligten nicht an der Synthese der Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, insbesondere an Metaboliten, die für 25 Konkurrenzreaktionen zuständig sind, d.h. es werden solche Stämme bevorzugt, bei denen ein zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyntheseweg mit verminderter Aktivität abläuft. So ist insbesondere ein, gegen L-Asparaginsäure-β-Methylester (AME) resistenter coryneformer Mikroorganismen-Stamm mit reduzierter Citrat-Synthase-Aktivität geeignet (EP 0 551 614). 30

Nach Isolierung sind Pyruvat-Carboxylase-Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz aufweisen. Desweiteren sind Gene mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109 gemäß SEQ ID No. 1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz erhältlich. Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate. die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei die Enzymaktivität bzw. -funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist. Diese Pyruvat-Carboxylase-Gene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

15

25

10

5

Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen ist vorzugsweise der tac-Promotor (lacI<sup>Q</sup>-Gen) vorgeschaltet, wobei diesem insbesondere regulatorische Sequenzen zugeordnet sind.

Durch Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens sind Plasmide erhältlich, die das Gen enthalten und zur Transformation eines Aminosäureproduzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von Corynebacterium handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid oder Vektor.

# Ausführungsbeispiel

# 5 1. Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus Corynebacterium glutamicum

Ausgehend von konservierten Bereichen aller bisher bekannten Pyruvat-Carboxylase-(pyc-)Genen, von Saccharomyces cerevisiae (J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315), Mensch (Biochim Biophys Acta 1994, 1227: 46-52). Maus (Proc Natl Acad Sci, USA 1993, 90: 1766-1770), Aedes aegypti (EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530) sowie von Mycobacterium tubercolosis (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech). Die Primer entsprachen den Basen 810 bis 831 und 1015 bis 1037 des pyc-Gens von M. tuberculosis. Mit diesen Primern konnte mittels PCR nach der Standardmethode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) für nicht-degenerierte, homolge Primer ein Fragment von ca. 200 bp aus chromosomaler DNA von C. glutamicum ATCC 13032, die wie bei Eikmanns et al. (Microbiology 1994, 140: 1817-1828) beschrieben, isoliert wurde, amplifiziert werden. Die Größe von 200 bp entsprach der Erwartung für pyc-Gene. Das PCR-Produkt wurde wie bei Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) beschrieben, sequenziert. Die Sequenzierung wurde mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur (Applied Biosystems) durchgeführt.

25

20

10

15

Ausgehend von diesem DNA-Fragment aus C. glutamicum wurden folgende homologe Oligonukleotide hergestellt:

- pyc 1 5'- CGTCTTCATCGAAATGAAC -3'
- pyc 2 5'- ACGGTGGTGATCCGGCACT -3'

9

Die Oligonukleotide wurden als PCR-Primer zur Isolierung einer Sonde für das Gen der Pyruvat-Carboxylase (pyc) aus C. glutamicum verwendet. Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von C. glutamicum und Digoxigeninmarkierten Nukleotiden eingesetzt. Die Reaktion wurde nach der Vorschrift des 'PCR DIG Labeling Kits' der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnte ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von ca. 200 bp entsprach. Die so hergestellte pyc-Sonde wurde dann eingesetzt, um über Southern-Blot-Hybridisierung ein DNA-Fragment in der chromosomalen DNA von C. glutamicum zu identifizieren, auf dem das pyc-Gen lokalisiert ist. Hierzu wurden jeweils 2 bis 5 µg chromosomaler DNA von C. glutamicum WT mit den Restriktionsenzymen HindIII, SphI, Sall, DraI, EcoRI und BamHI geschnitten, die erhaltenen DNA-Fragmente 16 h bei 20 V in einem 0,8 %igen Agarosegel gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die in dem Agarosegel befindlichen DNA-Fragmente wurden nach einer Methode von Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) denaturiert und vakuumunterstützt mit der VacuGene Blot Apparatur von Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) aus der Gelmatrix auf eine Nylon-Membran (Nytran N13 von Schleicher und Schüll, Dassel, Schweiz) transferiert, immobilisiert und die Digoxigeninmarkierung mittels NBT/X-Phosphat-Umsetzung durch alkalische Phosphatase nachgewiesen. Auf diese Weise konnten folgende, mit der pyc-DNA-Sonde hybridisierende chromosomale Fragmente nachgewiesen werden: ein 17 kb HindIII-Fragment, ein 6,5 kb Sall-Fragment und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment.

25

10

15

20

Das 17 kb HindIII-Fragment wurde isoliert und subkloniert. Dazu wurde eine Cosmid-Genbank aus chromosomaler DNA von C. glutamicum im Cosmid pHC79 verwendet, die das Genom von C. glutamicum zu 99% repräsentierte (Mol Microbiol 1992, 6: 317-326). Der E. coli-Stamm DH5α wurde mit dieser Genbank mittels der

CaCl2-Methode von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Habour Laboratory Press) transformiert und zu ca. 300 Kolonien pro LB-Agarplatte mit 50 µg/l Kanamycin ausplattiert (insgesamt 5000 Kolonien). Anschließend wurden die erhaltenen Transformanden auf Nytran N13-Filter übertragen und diese zur alkalischen Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA auf mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl getränktem Whatmann-Papier 5 min. inkubiert. Die darauffolgende Neutralisierung erfolgte mit 1 M Tris/HCl pH 7,5 und 1,5 M NaCl. Nach Inkubation der Filter in 2 x SSC wurde die freigesetzte DNA durch UV-Bestrahlung bei 366 nm auf dem Filter fixiert. Anschließend wurden die restlichen Zelltrümmer durch Schütteln in 3 x SSC, 0,1 % SDS bei 50°C entfernt. Die Filter wurden in dieser Form für die Hybridisierung mit einer spezifischen pyc-Sonde, wie bei Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) beschrieben, verwendet. Es wurden 3 Transformanden identifiziert, die gegen die pyc-Sonde hybridisierten. Aus diesen Transformanden wurde die Cosmid-DNA mittels Plasmid-Präparation nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim (Meth Enzymol 1983, 100: 243-255) isoliert und anschließend über Restriktion und Southern-Blot Analyse auf das Vorhandensein des HindIII-Fragments getestet. Das Cosmid pHC79-10, das ein 40 kb Insert enthielt, trug das 17 kb HindIII-Fragment vollständig und wurde weiter analysiert. Es zeigte sich, daß auch nach Restriktion mit den Endonukleasen Sall und EcoRI die gleichen hybridisierenden Fragmente wie in der chromosomalen DNA, d.h. ein 6,5 kb Sall- und ein 1,35 kb EcRI-Fragment, erhalten wurden. Das 17 kb HindIII-Fragment wurde durch Restriktion mit HindIII aus dem Cosmid isoliert und in den E. coli-Vektor pUC18, der ebenfalls mit HindIII geschnitten wurde, ligiert. Es wurde eine Restriktionsanalyse des Fragments in dem resultierenden Vektor pUCpyc erstellt. Die physikalische Kartierung des Fragments ist in Figur 1 dargestellt.

25

5

10

15

11

# 2. Sequenzierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens

In weiteren Subklonierungsschritten wurden ein 0,85 kb Sall-EcoRI-Fragment, das 5 1,35 kb EcoRI-Fragment, ein 1,6 kb EcoRI-EcoRI-StuI-Fragment sowie ein 1,6 kb Clai-Fragment, das partiell mit dem 0,85 kb Sali-EcoRi-Fragment überlappte, durch Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pUCpyc isoliert. Durch Ligation wurden die Fragmente in den jeweils entsprechend restringierten Vektor pUC18 kloniert und anschließend nach Sanger et al. (Proc Natl 10 Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) wie oben beschrieben sequenziert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Sequenzanalyse der Fragmente ergab ein durchgehendes offenes Leseraster von 3576 bp, das für eine Proteinsequenz von 1140 Aminosäuren kodiert. Ein Vergleich der 15 abgeleiteten Proteinsequenz mit der EMBL Gen-Datenbank (Heidelberg) ergab Ähnlichkeiten zu allen bekannten Pyruvat-Carboxylasen. Die höchste Identität (62%) wurde zur putativen Pyruvat-Carboxylase aus Mycobacterium tuberculosis (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) gefunden. Die Ähnlichkeit betrug, unter Berücksichtigung konservierter Aminosäureaustausche, 76%. Ein Vergleich mit den 20 Pyruvat-Carboxylasen anderer Organismen ergab 46 bis 47% identische und 64 bis 65% ähnliche Aminosäuren (Gene 1997, 191: 47-50; J Bacteriol 1996, 178: 5960-5970; Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 1766-1770; Biochem J 1996, 316: 631-637; EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530; J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß das 25 klonierte Fragment das Gen für die Pyruvat-Carboxylase aus C. glutamicum trägt. Die Nukleotidsequenz des Gens ist unter SEQ ID No.1 und die entsprechende Aminosäuresequenz unter SEQ ID No. 2 angegeben.

12

# 3. Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens

Zur Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase aus C. glutamicum wurde das Gen aus dem Plasmid pUCpyc als 6,2 kb Sspl-Scal-Fragment in den E. coli-C. Glutamicum-Pendelvektor pEK0 (Gene 1991, 102: 93-98) kloniert, der mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI geschnitten wurde. Mittels Klenow-Polymerase-Behandlung wurden die überhängenden Enden zu glatten Enden aufgefüllt (EcoRI) bzw. abgedaut (PstI), und der linearisierte Vektor wurde mit dem 6,2 kb Sspl-Scal-Fragment ligiert. Das erhaltene Konstrukt pEK0pyc wurde zunächst in den Stamm E. coli DH5α transformiert, die Plasmid-DNA auf den erhaltenen Transformanden isoliert und auf die Richtigkeit des Inserts durch Restriktion kontrolliert. Die DNA wurde anschließend in den Stamm SP733 durch Elektroporation eingebracht (FEMS Microbiol Lett 1989, 65: 299-304). Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Mutante des restriktionsnegativen C. glutamicum Staimmes R127 (Dechema Biotechnology Conference 1990, 4: 323-327, Verlag Chemie), die durch chemische Mutagenese erhalten worden war und sich dadurch auszeichnet, daß sie nicht auf Minimalmedium mit Pyruvat und Lactat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). Dieser Phänotyp wird durch einen Defekt in der Pyruvat-Carboxylase hervorgerufen und konnte durch das Einbringen des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus C. glutamicum komplementiert werden, d.h. der Stamm, der das Plasmid pEK0pyc trägt, war im Gegensatz zum Ausgangsstamm wieder in der Lage auf Minimalmedium mit Lactat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Damit war auch der Beweis erbracht, daß das Gen für eine funktionelle Pyruvat-Carboxylase kodiert.

Darüber hinaus wurde das Plasmid pEK0pyc in den C. glutamicum Wildtyp ATCC 13032 durch Elektroporation transformiert. Der resultierende Stamm WT (pEK0pyc)

25

5

10

15

13

wurde im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032 bezüglich seiner Pyruvat-Carboxylase-Aktivität untersucht. Die Stämme wurden in Komplexmedium (Luria-Bertani, Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 0,5 % Lactat und auf Minimalmedium mit 2 % Lactat bzw. 4 % Glukose gezüchtet, und der Pyruvat-Carboxylase-Test wurde entsprechend der Methode, wie sie bei Peters-Wendisch et al. (Microbiology 1997, 143: 1095-1103) beschrieben wurde, durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse (Tabelle 1) zeigt, daß die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität im pEK0-pyc-tragenden Stamm ca. 4-fach höher als im Ausgangsstamm war.

# 4. Gesteigerte Akkumulation von Lysin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm C. glutamicum DG52-5

Zur Untersuchung der Auswirkung der Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase in dem Lysin-Produktionsstamm DG52-5 (J Gen Microbiol 1988, 134: 3221-3229) wurde der Expressionsvektor pVWEX1 verwendet, der eine IPTG-induzierbare Expression erlaubt. In diesen Vektor wurde das pyc Gen promotorlos hinein kloniert. Dazu wurden zunächst PCR-Primer (Primer 1 = Position 112 - 133; Primer 2 = Position 373 bis 355 in der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 1) synthetisiert und 261 bp des promotorlosen Anfangsbereichs des Pyruvat-Carboxylase-Gens mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß Primer 1 eine PstI-Schnittstelle vermittelt und Primer 2 eine BamHI-Schnittstelle. Nach der PCR wurde das erhaltene 274 bp PCR-Produkt isoliert, zu Konkatemeren ligiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen Pst1 und BamHI geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde durch Ethanol-Fällung ankonzentriert und anschließend mit dem PstI-BamHI-geschnittenen Vektor pVWEX1 ligiert. Das erhaltene Konstrukt

25

10

15

14

pVWEX1-PCR wurde durch Restriktion getestet. Der Endbereich des pyc Gens wurde durch RcaI-Klenow-SalI-Behandlung aus dem Vektor pEK0pyc isoliert und in den BamHI-Klenow-SalI behandelten Vektor pVWEX1-PCR ligiert. Das erhaltene Konstrukt pVWEX1pyc wurde durch Restriktionskartierung analysiert. Eine physikalische Karte des Plasmids ist in Figur 2 gezeigt.

Das Plasmid wurde durch Elektroporation in den C. glutamicum Stamm DG52-5 eingebracht. Als Kontrolle wurde der Stamm DG52-5 mit dem Vektor pVWEX1 ohne Insert transformiert und die L-Lysinausscheidung jeweils drei verschiedener Transformanden verglichen. Dazu wurden DG52-5(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DG52-5(pVWEX1pyc)3, 4 und 6 in Komplexmedium (2xTY; Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden jeweils zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Lysinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 2 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer um 50 % gesteigerten Akkumulation von Lysin im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

25

5

10

15

10

15

20

15

5. Gesteigerte Akkumulation von Threonin und Homoserin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm C. glutamicum DM368-3

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-Bildung wurde auch die Akkumulation von Threonin im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Threoninproduktionsstamm C. glutamicum DM368-3 (Degussa AG) mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Threoninausscheidung von jeweils drei verschiedenen Transformanden untersucht. Dazu wurden DM368-3(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DM368-3(pVWEX1pyc)1, 2 und 3 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Threoninmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 3 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer ca. 40%igen Steigerung der Threoninkonzentration im Medium führt. Somit stell die Nutzung des endeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Threoninbildung entscheidend zu verbessern.

Desweiteren zeigte die Aminosäurekonzentrationsbestimmung, daß überraschenderweise der Stamm mit überexprimiertem Pyruvat-Carboxylase-Gen außerdem etwa 150% mehr Homoserin ins Medium ausschied als der Stamm mit nicht überexprimiertem Gen. Die entsprechenden Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3 dargestellt. Sie machen deutlich, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren sowohl die Threonin- als auch die Homoserinbildung entscheidend verbessert werden kann.

# 10 6. Gesteigerte Akkumulation von Glutamat durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase im Wildtyp von C. glutamicum

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-, L-Threonin- und L-Homoserin-Bildung (siehe oben unter 4. und 5.)wurde auch die Akkumulation von Glutamat im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Wildtyp C. glutamicum ATCC 13032 mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Glutamatausscheidung von jeweils zwei verschiedenen Transformanden untersucht. Dazu wurde C. glutamicum ATCC 13032 (pVWEX1pyc) D1 und D2 sowie C. glutamicum ATCC 13032 (pVWEX1pyc) 1 und 2 in Komplexmedium (2xTY mit 50 μg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Zur Induktion der Glutamatausscheidung wurde dem Medium ca. 6 Stunden nach dem Inokulieren 25 mg Tween 60 pro ml zugesetzt. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg lPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte. Glutamatmenge bestimmt. Die Bestimmung der

15

10

17

Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 4 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils zwei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer bis zu 500%igen Steigerung der Glutamatkonzentration im Medium führt. Somit stell die Nutzung des endeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Glutamatbildung entscheidend zu verbessern.

Stamm	IPTG [µg/ml]	Pyruvat-Carboxylase [nmol min <sup>-1</sup> mg Trockengewicht <sup>-1</sup> ]
13032(pEK0pyc)	0	75 ± 13
ATCC 13032	0	· 19 ± 4
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	88 ± 13
·	0	11 ± 2
DG52-5(pVWEX1)	200	5 ± 2
,	0	6 ± 1
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	76 ± 10
	0	12 ± 3
DM368-3(pVWEX1)	200	10 ± 1
	0	11 ± 2

Tabelle 1

Stamm	IPTG [µg/ml]	Lysin [mM]
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	35,4 ± 2,6
	0	23,6 ± 2,9
DG52-5(pVWEX1)	200	23,3 ± 2,9
	0	22,1 ± 4,0

Tabelle 2

Stamm	IPTG [µg/ml]	Threonin [mM]	Homoserin [mM]
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	10,2 ± 0,5	14,4 ± 1,2
	0	$7,9 \pm 1,0$	5,6 ± 0,2
- DM368-3(pVWEX1)	200	$8,0 \pm 0,5$	5,8 ± 0,7
	0	7,5 ± 0,8	6,1 ± 1,0

Tabelle 3

Stamm	IPTG [µg/ml]	Glutamat [mM]	
ATCC 13032	200	11 ± 2	
ATCC 13032	0	13 ± 2	
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	200	67 ± 4	
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	0	32 ± 4	

Tabelle 4

# 5 Patentansprüche

- Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartatund/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
- Verfahren nach Anspruch I,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß durch Mutation des endogenen Pyruvat-Carboxylase-Gens ein Enzym mit höherer Pyruvat-Carboxylase-Aktivität erzeugt wird.
- 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
  20 dadurch gekennzeichnet,
  daß die Genexpression der Pyruvat-Carboxylase durch Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird.
- 4. Verfahren nach Anspruch 3,
  25 da durch gekennzeichnet,
  daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.

- 5. Verfahren nach Anspruch 4,
   d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
   daß das Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
- 6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,
   d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
   daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
- 7. Verfahren nach Anspruch 6,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  15 daß ein Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
- Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
   d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
   daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind und / oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen.
- 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

20

- 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9,
  - dadurch gekennzeichnet,
- daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, bei dem ein zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyntheseweg mit verminderter Aktivität abläuft.
- 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

  d a'd urch gekennzeichnet,

  daß das Pyruvat-Carboxylase-Gen aus einem Mikroorganismus-Stamm der

  Gattung Corynebacterium isoliert wird.
  - 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
    dadurch gekennzeichnet,
    daß die Genexpression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht wird.
    - 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
      dadurch gekennzeichnet,
      daß dem Pyruvat-Carboxylase-Gen der tac-Promotor vorgeschaltet wird.
- 14. Verfahren nach Anspruch 13,
  gekennzeichnet durch
  dem tac-Promotor zugeordnete regulatorische Sequenzen.
  - 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
    dadurch gekennzeichnet,
    daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit einer für die unter SEQ ID
    No. 2 angegebenen Aminosäuresequenzund deren Allelvariationen

kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15, da durch gekennzeichnet, daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.

10

15

20

- 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von Lysin, Threonin, Homoserin, Glutamat und/oder Arginin.
- 18. Pyruvat-Carboxylase-Gen mit einer für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz und / oder deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.
- 19. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.
- 20. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.
- 21. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit vorgeschaltetem tac-Promotor

22. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 21 mit dem Promotor zugeordneten regulatorischen Sequenzen.

5

10

- 23. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 20 mit diesem zugeordnete regulatorische Gensequenzen.
- Genstruktur, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23.
  - 25. Vektor, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.
- 26. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Pyruvat Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Ansprüch 24.
  - 27. Transformierte Zelle nach Anspruch 26, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 25.
  - 28. Transformierte Zelle nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Gattung Corynebacterium angehört.

25

30

20

29. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 28, dad urch gekennzeichnet, daß in dieser die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme und / oder die am Export der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind.

30. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 29,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden
Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

- 31. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 30,
  dadurch gekennzeichnet,
  daß sie einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
- 32. Verwendung eines Pyruvat-Carboxylase-Gens zur Steigerung der
   Produktion von aus der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie stammenden
   Aminosäuren von Mikroorganismen.
- 33. Verwendung nach Anspruch 32,
   dadurch gekennzeichnet,
   daß ein mutiertes Pyruvat-Carboxylase-Gen, das für ein Enzym mit erhöhter
   Pyruvat-Carboxylase-Aktivität kodiert, verwendet wird.
- 34. Verwendung nach Anspruch 32 oder 33,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  daß der die entsprechende Aminosäure produzierende Mikroorganismus mit einem Genkonstrukt, das ein Pyruvat-Carboxylase-Gen enthält, transformiert wird.

10

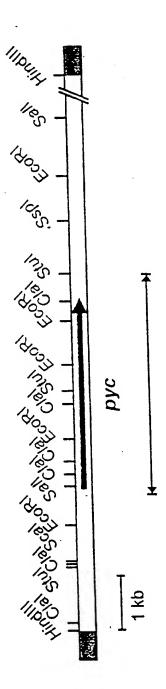
15

35. Verwendung nach Anspruch 34,dadurch gekennzeichnet,daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen enthält.

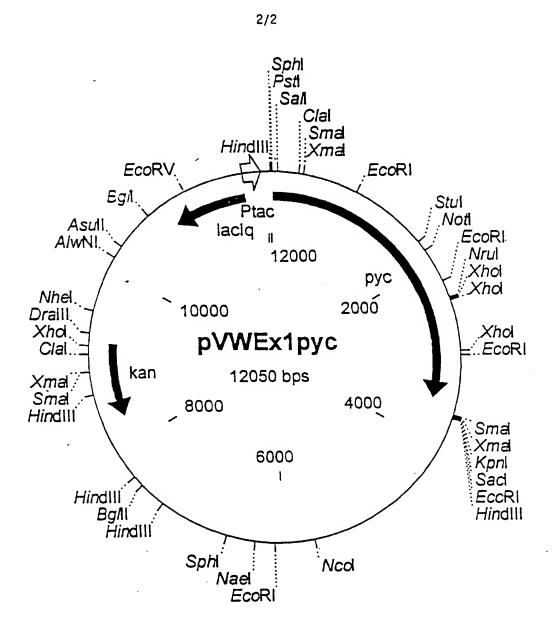
28

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 35,dadurch gekennzeichnet,daß ein Pyruvat-Carboxylase-Gen aus Corynebacterium verwendet wird.

37. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus Corynebacterium verwendet wird.



igur



Figur 2

# SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE	ANGABEN:
----------------	----------

4	i	۱ 2	NTN	T TD	DER	
		, ,	$u_{II}$	164	ULK	

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Postfach 1913
- (C) ORT: Juelich
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 52425
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pyruvat Carboxylase
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
  - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

# (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 3728 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKULS: Genom-DNA

# (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCAACCGTG	CTTGAAGTCG	TGCAGGTCAG	GGGAGTGTTG	CCCGAAAACA	TTGAGAGGAA	60
ААСАААААСС	GATGTTTGAT	TGGGGGAATC	GGGGGTTACG	ATACTAGGAC	GCAGTGACTG	120
CTATCACCCT	TGGCGGTCTC	TTGTTGAAAG	GAATAATTAC	TCTAGTGTCG	ACTCACACAT	180
CTTCAACGCT	TCCAGCATTC	AAAAAGATCT	TGGTAGCAAA	CCGCGGCGAA	ATCGCGGTCC	240
GTGCTTTCCG	TGCAGCACTC	GAAACCGGTG	CAGCCACGGT	AGCTATTTAC	CCCCGTGAAG	300
ATCGGGGATC	ATTCCACCGC	TCTTTTGCTT	CTGAAGCTGT	CCGCATTGGT	ACCGAAGGCT	360
CACCAGTCAA	GGCGTACCTG	GACATCGATG	AAATTATCGG	TGCAGCTAAA	AAAGTTAAAG	420
CAGATGCCAT	TTACCCGGGA	TACGGCTTCC	TGTCTGAAAA	TGCCCAGCTT	GCCCGCGAGT	480

GTGCGGAAAA CGGCATTACT TTTATTGGCC CAACCCCAGA GGTTCTTGAT CTCACCGGTG	540
ATAAGTCTCG CGCGGTAACC GCCGCGAAGA AGGCTGGTCT GCCAGTTTTG GCGGAATCCA	600
CCCCGAGCAA AAACATCGAT GAGATCGTTA AAAGCGCTGA AGGCCAGACT TACCCCATCT	660
TTGTGAAGGC AGTTGCCGGT GGTGGCGGAC GCGGTATGCG TTTTGTTGCT TCACCTGATG	720
AGCTTCGCAA ATTAGCAACA GAAGCATCTC GTGAAGCTGA AGCGGCTTTC GGCGATGGCG	780
CGGTATATGT CGAACGTGCT GTGATTAACC CTCAGCATAT TGAAGTGCAG ATCCTTGGCG	840
ATCACACTGG AGAAGTTGTA CACCTTTATG AACGTGACTG CTCACTGCAG CGTCGTCACC	900
AAAAAGTTGT CGAAATTGCG CCAGCACAGC ATTTGGATCC AGAACTGCGT GATCGCATTT	960
GTGCGGATGC AGTAAAGTTC TGCCGCTCCA TTGGTTACCA GGGCGCGGGA ACCGTGGAAT	1020
TCTTGGTCGA TGAAAAGGGC AACCACGTCT TCATCGAAAT GAACCCACGT ATCCAGGTTG	1080
AGCACACCGT GACTGAAGAA GTCACCGAGG TGGACCTGGT GAAGGCGCAG ATGCGCTTGG	1140
CTGCTGGTGC AACCTTGAAG GAATTGGGTC TGACCCAAGA TAAGATCAAG ACCCACGGTG	1200
CAGCACTGCA GTGCCGCATC ACCACGGAAG ATCCAAACAA CGGCTTCCGC CCAGATACCG	1260
GAACTATCAC CGCGTACCGC TCACCAGGCG GAGCTGGCGT TCGTCTTGAC GGTGCAGCTC	1320
AGCTCGGTGG CGAAATCACC GCACACTTTG ACTCCATGCT GGTGAAAATG ACCTGCCGTG	1380
GTTCCGACTT TGAAACTGCT GTTGCTCGTG CACAGCGCGC GTTGGCTGAG TTCACCGTGT	1440
CTGGTGTTGC AACCAACATT GGTTTCTTGC GTGCGTTGCT GCGGGAAGAG GACTTCACTT	1500
CCAAGCGCAT CGCCACCGGA TTCATTGCCG ATCACCCGCA CCTCCTTCAG GCTCCACCTG	1560
CTGATGATGA GCAGGGACGC ATCCTGGATT ACTTGGCAGA TGTCACCGTG AACAAGCCTC	1620
ATGGTGTGCG TCCAAAGGAT GTTGCAGCTC CTATCGATAA GCTGCCTAAC ATCAAGGATC	1680
TGCCACTGCC ACGCGGTTCC CGTGACCGCC TGAAGCAGCT TGGCCCAGCC GCGTTTGCTC	174
GTGATCTCCG TGAGCAGGAC GCACTGGCAG TTACTGATAC CACCTTCCGC GATGCACACC	180
AGTOTTTGCT TGCGACCCGA GTCCGCTCAT TCGCACTGAA GCCTGCGGCA GAGGCCGTCG	186
CAAAGCTGAC TCCTGAGCTT TTGTCCGTGG AGGCCTGGGG CGGCGCGACC TACGATGTGG	192
CGATGCGTTT CCTCTTTGAG GATCCGTGGG ACAGGCTCGA CGAGCTGCGC GAGGCGATGC	198
CGAATGTAAA CATTCAGATG CTGCTTCGCG GCCGCAACAC CGTGGGATAC ACCCCGTACC	204
CARREST CONTROL OF THE CONTROL AND CONTROL OF CONTROL O	210

GCATCTTCGA	CGCGCTTAAC	GACGTCTCCC	AGATGCGTCC	AGCAATCGAC	GCAGTCCTGG	2160
AGACCAACAC	CGCGGTAGCC	GAGGTGGCTA	TGGCTTATTC	TGGTGATCTC	TCTGATCCAA	2220
ATGAAAAGCT	CTACACCCTG	GATTACTACC	TAAAGATGGC	AGAGGAGATC	GTCAAGTCTG	2280
GCGCTCACAT	CTTGGCCATT	AAGGATATGG	CTGGTCTGCT	TCGCCCAGCT	GCGGTAACCA	2340
AGCTGGTCAC	CGCACTGCGC	CGTGAATTCG	ATCTGCCAGT	GCACGTGCAC	ACCCACGACA	2400
CTGCGGGTGG	CCAGCTGGCA	ACCTACTTTG	CTGCAGCTCA	AGCTGGTGCA	GATGCTGTTG	2460
ACGGTGCTTC	CGCACCACTG	TCTGGCACCA	CCTCCCAGCC	ATCCCTGTCT	GCCATTGTTG	2520
CTGCATTCGC	GCACACCCGT	CGCGATACCG	GTTTGAGCCT	CGAGGCTGTT	TCTGACCTCG	2580
AGCCGTACTG	GGAAGCAGTG	CGCGGACTGT	ACCTGCCATT	TGAGTCTGGA	ACCCCAGGCC	2640
CAACCGGTCG	CGTCTACCGC	CACGAAATCC	CAGGCGGACA	GTTGTCCAAC	CTGCGTGCAC	2700
AGGCCACCGC	ACTGGGCCTT	GCGGATCGTT	TCGAACTCAT	CGAAGACAAC	TACGCAGCCG	2760
TTAATGAGAT	GCTGGGACGC	CCAACCAAGG	TCACCCCATC	CTCCAAGGTT	GTTGGCGACC	2820
TCGCACTCCA	CCTCGTTGGT	GCGGGTGTGG	ATCCAGCAGA	CTTTGCTGCC	GATCCACAAA	2880
AGTACGACAT	CCCAGACTCT	GTCATCGCGT	TCCTGCGCGG	CGAGCTTGGT	AACCCTCCAG	2940
GTGGCTGGCC	AGAGCCACTG	CGCACCCGCG	CACTGGAAGG	CCGCTCCGAA	GGCAAGGCAC	3000
CTCTGACGĢA	AGTTCCTGAG	GAAGAGCAGG	G CGCACCTCGA	CGCTGATGAT	TCCAAGGAAC	3060
GTCGCAATAG	CCTCAACCGC	CTGCTGTTCC	CGAAGCCAAC	: CGAAGAGTTC	CTCGAGCACC	3120
GTCGCCGCTT	CGGCAACACC	: TCTGCGCTGC	ATGATCGTGA	ATTCTTCTAC	GGCCTGGTCG	3180
AAGGCCGCGA	GACTTTGATO	CGCCTGCCAC	ATGTGCGCAC	CCCACTGCTT	GTTCGCCTGG	3240
ATGCGATCT	TGAGCCAGAC	GATAAGGGT?	A TGCGCAATGI	TGTGGCCAAG	GTCAACGGCC	3300
AGATCCGCCC	AATGCGTGTG	CGTGACCGC	CCGTTGAGT	TGTCACCGCA	A ACCGCAGAAA	3360
AGGCAGATTO	CTCCAACAAC	GGCCATGTT	G CTGCACCAT	CGCTGGTGT	r gtcaccgtga	3420
CTGTTGCTG	A AGGTGATGAC	GTCAAGGCT	G GAGATGCAG	CGCAATCAT	C GAGGCTATGA	3480
AGATGGAAG	AACAATCACT	GCTTCTGTT	G ACGGCAAAA	r cgatcgcgt	T GTGGTTCCTG	3540
CTGCAACGA	A GGTGGAAGG	GGCGACTTG	A TCGTCGTCG	T TTCCTAAAC	C TTTCTGTAAA	3600
AAGCCCCGC	G TCTTCCTCA	GGAGGAGGC	G GGGCTTTTT	G GGCCAAGAT	G GGAGATGGGT	3660
GAGTTGGAT	T TGGTCTGAT	r cgacacttt	T AAGGGCAGA	g atttgaaga	T GGAGACCAAG	3720

**GCTCAAAG** 

3728

### (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1140 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

### (ii) ART DES MOLEKULS: Protein

### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu

Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu

Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly

Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu

Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala

Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu

Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr 105

Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser 125 120

Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu

Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly

Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Arg

Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr 185

Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr

		195				:	200					205			
Val	Glu 210	Arg	Ala	Val		Asn 1 215	Pro (	Gln	His	Ile	Glu 220	Val	Gln	Ile	Leu
Gly 225	Asp	His	Thr	Gly	Glu ' 230	Val '	Val	His	Leu	Tyr 235	Glu	Arg	Asp	Cys	Ser 240
Leu	Gln	Arg	Arg	His 245	Gln	Lys	Val	Val	Glu 250	Ile	Ala	Pro	Ala	Gln 255	His
Leu	Asp	Pro	Glu 260	Leu	Arg .	Asp	Arg	Ile 265	Cys	Ala	Asp	Ala	Val 270	Lys	Phe
Cys	Arg	Ser 275	Ile	Gly	Tyr	Gln	Gly 280	Ala	Gly	Thr	Val	Glu 285	Phe	Leu	Val
Asp	Glu 290		Gly	Asn	His	Val 295	Phe	Ile	Glu	Met	Asn 300	Pro	Arg	Ile	Gln
Val 305		His	Thr	Val	Thr 310	Glu	Glu	Val	Thr	Glu 315		Asp	Leu	Val	Lys 320
Ala	Gln	Met	Arg	Leu 325	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr 330		Lys	Glu	Leu	Gly 335	Leu
Thr	Gln	. Asp	Lys 340	Ile	Lys	Thr	His	Gly 345		Ala	Leu	Gln	Cys 350		Ile
Thr	Thr	: Glu 355		Pro	Asn	Asn	Gly 360		Arg	Pro	Asp	Thr 365		Thr	Ile
Th	370		: Arg	g Ser	Pro	Gly 375		Ala	Gly	/ Val	380		Asp	Gly	/ Ala
Ala 385		n Lei	ı Gly	y Gly	Glu 390	Ile	Thr	Ala	His	395		Ser	: Met	: Leı	1 Val 400
Ly	s Me	t Th	r Cys	405		Ser	Asp	Phe	Gl: 410		r Ala	a Val	L Ala	415	Ala 5
Gl	n Ar	g Al	a Let 42		Glu	Phe	Thr	Val		r Gl	y Vai	l Ala	43		n Ile
G1	y Ph	e Le 43		g Ala	a Leu	Lev	440		ı Gl	u As	p Ph	e Th:		r Ly	s Arg
Il	e Al 45		r Gl	y Phe	e'Ile	Ala 455		p Hi	s Pr	o Hi	s Le 46		u Gl	n Al	a Prò
Pr 46		a As	p As	p Gl	u Glr 470		y Ar	g Il	e Le	u As 47		r Le	u Al	a As	p Val 480

Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro

				485					490					495	
le	Asp	Lys	Leu 500	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp 505	Leu	Pro	Leu	Pro	Arg 510	Gļy	Ser
Arg	Asp	Arg 515	Leu	Lys	Gln	Leu	Gly 520	Pro	Ala	Ala	Phe	Ala 525	Arg	Asp	Leu
Arg	Glu 530	Gln	Asp	Ala	Leu	Ala 535	Val	Thr	Asp	Thr	Thr 540	Phe	Arg	Asp	Ala
His 545	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala 550	Thr	Arg	Val	Arg	Ser <b>5</b> 55	Phe	Ala	Leu	Lys	Pro 560
Ala	Ala	Glu	Ala	Val 565	Ala	Lys	Lys	Thr	Pro 570	Glu	Leu	Leu	Ser	Val 575	Glu
Ala	Trp	Gly	Gly 580	Ala	Thr	Tyr	Asp	Val 585	Ala	Met	Arg	Phe	Leu 590	Phe	Glu
Asp	Pro	Trp 595	Asp	Arg	Leu	Asp	Glu 600	Leu	Arg	Glu	Ala	Met 605	Pro	Asn	Val
Asn	Ile 610	Gln	Met	Leu	Leu	Arg 615	Gly	Arg	Asn	Thr	Val 620	Gly	Tyr	Thr	Pro
Tyr 625	Pro	Asp	Ser	Val	Cys <b>63</b> 0	Arg	Ala	Phe	Val	Lys 635	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser 640
Gly	Val	Asp	Ile	Phe 645	Arg	Ile	Phe	Asp	Ala 650		Asn	Asp	Val	Ser 655	Gln
Met	Arg	Pro	Ala 660	Ile	Asp	Ala	Val	Leu 665		Thr	Asn	Thr	Ala 670	Val	Ala
Glu	Val	Ala 675		Ala	Tyr	Ser	Gly 680		Leu	Ser	Asp	Pro 685		Glu	Lys
Leu	Tyr 690		Leu	Asp	Tyr	Tyr 695		Lys	Met	Ala	Glu 700		Ile	Val	Lys
Ser 705		Ala	His	Ile	Leu 710		Ile	. Lys	Asp	715		Gly	Leu	Leu	Arg 720
Pro	Ala	Ala	a Val	. Thr 725		Leu	ı Val	. Thr	730		Arg	Arg	Glu	735	Asp
Leu	Pro	Val	1 His		. His	Thr	: His	745		: Ala	Gly	Gly	750		Ala
Thr	ту	75		a Ala	Ala	Glr	n Ala 760		/ Ala	a Asp	Ala	Val 765	Asp	Gly	/ Ala

Ser Ala Pro Leu Ser Gly Thr Thr Ser Gln Pro Ser Leu Ser Ala Ile

770 775 780

Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu 785 790 795 800

- Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr
  805 810 815
- Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg 820 825 830
- His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr 835 840 845
- Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala 850 855 860
- Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser 865 870 875 880
- Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp 885 890 895
- Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser 900 905 910
- Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp 915 920 925
- Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys 930 935 940
- Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala 945 950 955 960
- Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro 965 970 975
- Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr 980 985 990
- Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg 995 1000 1005
- Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val Arg 1010 1015 1020
- Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn Val Val 1025 1030 1035 1040
- Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg Asp Arg Ser 1045 1050 1055
- Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp Ser Ser Asn Lys

1060

1065

1070

Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val Thr Val Thr Val Ala 1075 1080 1085

Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Ile Ile Glu Ala 1090 . 1095 1100

Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp 1105 1110 1115 1120

Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile 1125 1130 1135

Val Val Val Ser 1140

## INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/18228

**A3** 

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

15. April 1999 (15.04.99)

20. Mai 1999 (20.05.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/06210

(22) Internationales Anmeldedatum:

30. September 1998 (30.09.98) RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE,

DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, ID, JP, KR, MX,

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(30) Prioritätsdaten:

197 43 894.6 198 31 609.7

4. Oktober 1997 (04.10.97) 14. Juli 1998 (14.07.98)

DE DE

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen-

berichts:

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Postfach 1913, D-52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder: und

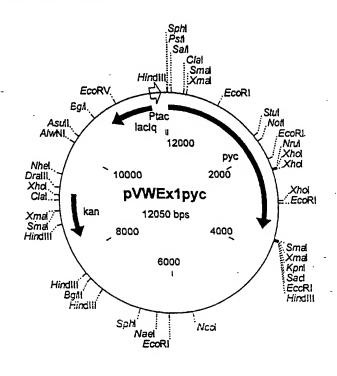
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIKMANNS, Bemd [DE/DE]; Gleißelstetten 49, D-89081 Ulm (DE). PE-TERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Steinenkamp 1, D-51496 Bergisch-Gladbach (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Julich (DE).
- (74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker-Gundahl-Strasse 36, D-81479 München (DE).
- (54) Title: METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DER ASPARTAT- UND/ODER GLUTAMATFAMILIE UND IM VERFAHREN EINSETZBARE MITTEL

#### (57) Abstract

The invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family in which the pyruvate-carboxylase activity is increased by genetically changing the enzyme and/or the pyruvate-carboxylase gene expression of a microorganism which produces the corresponding amino acid. In addition, the invention relates to a pyruvate-carboxylase gene and additional agents which can be used in the inventive method.

#### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosaure produzieren Mikroorganismus wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat-Carboxylase-Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.



# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

		ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AL		FI	Spanien Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
A٨			•	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑT		FR	Frankreich	LV	Lettland	SZ	Swasiland
Αl		GA	Gabun		Monaco	TD	Tschad
A2	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC		TC	Togo
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TJ	Tadschikistan
BE	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TM	Turkmenistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische		Türkei
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	
BC	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	ΙE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
Bł	R Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
В	/ Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
C/	A Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CI	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UΖ	Usbekistan
C	•	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CI	•	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
Cı		KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
C:			Korea	PL	Polen		
C		KR	Republik Korea	PT	Portugal		
C		ΚZ	Kasachstan	RO	Rumánien		
C		LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
D	- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		•
D		LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
		LR	Liberia	SG	Singapur		
E	E Estland	LIN	G100.14		O E		
I							

#### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 98/06210

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>6</sup>: Cl2P 13/20, Cl2N 15/60 // (Cl2P 13/20, Cl2R 1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

#### FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>6</sup>: Cl2P, Cl2N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH

# C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Microbiology, Vol. 144, 1998,  Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: Characterization, expression and inactivation of the pyc gene", page 915 - page 927, see the whole article	1–37
P,X	EMBL, Databas Genbank/DDBJ, Accession no. Y09548, Peters-Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: Characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 February 1998 page 20-109, 165-3587	
x	Appl Microbiol Biotechnol; Vol. 47, 1997; S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", page 430 - page 440, see the whole article, in paricular page 431, column 2, limes 7-18	1-37

1	x	Further documents are listed in the continuation of Box C	2.
١,		, . <del></del>	

See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
- document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 17 February 1999 (17.02.99)

Date of mailing of the international search report 09 March 1999 (09.03.99)

Authorized officer Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/06210

		PCI/EP	98/06210					
C (Continua	C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT							
Category*	· Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	vant passages	Relevant to claim No.					
Α	Microbiolgy, Vol. 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate as an Analplerotic enzyme in Corynebaceriu um", page 1095 - page 1103, see the abstract an discussion	m glutamic-	1–37					
A	Chemical Abstracts, Vol. 126, Nr 12, 24 March (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebac glutamicum. Studies of the significance of lpyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-cin the central metabolism and in amino action", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forsch july 1996, 1-121	-Wendisch, cterium f phosphoeno- carboxylase d produc-	1–37					
А	Applied and Environmental Microbiology, Vol. 6 February 1996, Muriel Cocaign-Bousquet et "Growth Rate-Dependent Modulation of carbo through Central Metabolism and the Kinetic ces for Glucose-Limited Chemostat Cultures bacterium glutamicum", page 429 - page 436 abstract; page 433, column 2, lines 6-32	al, on Flux c Consequen- s of Coryne-	1–37					
A	EP 0723011 Al (AJINOMOTO CO., INC.), 24 July (24.07.96), see abstract	1996	1–37					
Α .	Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", Library, September 1994, a.a. 1-1144	t al: EMBL Data	18					

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

02/02/99

International application No.
PCT/EP 98/06210

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 0723011 A1	24/07/96	AU BR PL SK CA CN CZ HU JP WO JP		A A A A A A D A A	09/10/97 21/03/95 21/01/97 10/06/96 06/11/96 02/03/95 16/10/96 12/06/96 30/09/96 00/00/00 02/05/95 02/03/96

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/06210

# A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC6: C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

#### B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC6: C12P, C12N

Recherte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH

#### C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichning der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	Microbiology, Band 144, 1998, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", Seite 915 - Seite 927, Siehe den ganzen Artikel	1-37
	<del></del>	
P,X	EMBL, Databas Genbank/DDBJ, accession no. Y09548, Peters-Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 Feb 1998, nt 20-109, 165-3587	18-25
	<del></del>	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von
Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.

Siehe Anhang Patentfamilie.

- Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Priontätsampruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchen- "Y" bencht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- Veröffentlichung, die sich auf eine mundliche Öffenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder der Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidier sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X"
  - Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachman naheliegen

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 0 9, 03, 99

#### 17 Februar 1999

Numme una Postunsanriit der auternationalen Regnerenennen i-

sevollmächtigter Bediensteter

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016

HAMPUS RYSTEDT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06210

(Fortset	zung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
ategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht	Betr. Anspruch Nr.
X	Appl Microbiol Biotechnol, Band 47, 1997, S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", Seite 430 - Seite 440, Siehe den ganzen Artikel, besonders Seite 431, Spalte 2, Zeilen 7-18	1-37
A	Microbiology, Band 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in Corynebacerium glutamicum", Seite 1095 - Seite 1103, Siehe die Zusammenfassung und die Diskussion	1-37
A	Chemical Abstracts, Band 126, Nr 12, 24 März 1997 (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Wendisch, Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebacterium glutamicum. Studies of the significance of phosphoenolpyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-carboxylase in the central metabolism and in amino acid production", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forschungszent. Juelich 1996, 1-121	1-37
A	Applied and Environmental Microbiology, Band 62, Nr 2, Februar 1996, Muriel Cocaign-Bousquet et al, "Growth Rate-Dependent Modulation of Carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequences for Glucose-Limited Chemostat Cultures of Corynebacterium glutamicum", Seite 429 - Seite 436, Siehe die Zusammenfassung; Seite 433, Spalte 2, Zeilen 6-32	1-37
A	EP 0723011 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 24 Juli 1996 (24.07.96), Siehe die Zusammenfassung	1-37

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06210

	<u> </u>		
C (Fortsetz	ning). ALS WESENTLICH ANGESEHÈNE UNTERLAGEN		
Categorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht	Betr. Anspruch Nr.
A	Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et al: "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", EMBL Data Library, September 1994, a.a. 1-1144		18
		,	
	·		
	·		
		-	
		_	
	* .	-	
	PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)		

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören 02/02/99

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06210

Im Recherchenbericht angefurtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	N	litglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0723011 A1	24/07/96	AU BR PL SK CA CN CZ HU JP WO JP	682547 B 8099194 A 9407625 A 313119 A 20496 A 2169170 A 1133615 A 9600524 A 73690 A 9600240 D 7111890 A 9506114 A 8070860 A	09/10/97 21/03/95 21/01/97 10/06/96 06/11/96 02/03/95 16/10/96 12/06/96 30/09/96 00/00/00 02/05/95 02/03/95